

回転分子モーター制御機構解明への再構成的アプローチ

著者	川岸 郁朗
雑誌名	科学研究費助成事業 研究成果報告書
ページ	1-14
発行年	2020-06-18
URL	http://hdl.handle.net/10114/00024411

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0026

研究課題名（和文）回転分子モーター制御機構解明への再構成的アプローチ

研究課題名（英文）Reconstitutive studies on molecular mechanisms underlying regulation of rotational molecular machines

研究代表者

川岸 郁朗（Kawagishi, Ikuro）

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：80234037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000 円

研究成果の概要（和文）：シグナル伝達タンパク質CheYが細菌べん毛モーターの回転方向を制御するメカニズムの解明を目指した。まず、大腸菌モーターの回転が、高圧力下で一方向に固定される現象に着目した。変異体を用いた実験とMDシミュレーションにより、この現象がCheYとモータータンパク質FliMの親和性の低下に起因することが示され、この相互作用が回転制御の決定的ステップであると結論された。つぎに、コレラ菌極べん毛モーターに関して、キメラFliMとその変異体が大腸菌内で発現させる、構成的アプローチを用いて解析した。その結果、極毛性細菌の忌避応答は、モーター回転方向制御の協同性が低く調整されることにより実現されると結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌べん毛モーターは、細胞膜を介したイオン流のエネルギーを利用する回転分子機械である。その作動原理を解明することで、人工ナノデバイスの開発や新たなドラッグデリバリー手法の開発などに繋がると注目されている。べん毛モーターのユニークな性質として、外部からの刺激により、イオン流の向きを変えずに瞬時に回転方向をスイッチできることが挙げられる。このスイッチに関わるタンパク質は同定されているが、スイッチの分子機構は未解明である。本研究では、多角的なアプローチによりスイッチ機構に関する本質的知見を得た。

研究成果の概要（英文）：The bacterial flagellar motor is a nanometer-size rotary molecular machine driven by ion flux. One remarkable feature of the motor is that its rotation can be instantaneously switched from counterclockwise to clockwise upon binding of the active form of the cytoplasmic signaling protein CheY. Here we found that higher hydrostatic pressure weakens the CheY-FliM interaction, demonstrating that is a critical step for the regulation of motor rotation. We also showed that in bacteria with a polar flagellum, cooperativity of the CheY-FliM interaction is tuned to be low and that this is a key feature essential for repellent responses. Our finding sheds new light on the motor switching mechanism.

研究分野：分子生物学，生物物理学

キーワード：べん毛モーター 走化性 回転制御 二成分制御系 圧力 蛋白質構造 MD 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モデルシステムとしての細菌走化性

地球上のあらゆる環境に棲息する細菌にとって、走化性は環境中での生存戦略に極めて重要であるばかりでなく、病原性や共生の確立にも重要な役割を果たす(川岸, 2006)。モデル生物である大腸菌では、細胞膜を貫通する走化性受容体が刺激を受けると、ヒスチジンキナーゼ CheA の活性が調節され、レスポンスレギュレーター CheY のリン酸化レベルが変化して、最終的にはべん毛回転方向が制御される(図 1)。走化性シグナル伝達経路の個々の素子に関しては詳細な解析が進んでおり、システム全体としての振る舞いの解明に最も近い系の一つである。しかし、とくに、モーター回転方向切り替えの分子機構に関しては未解明な点が多い。

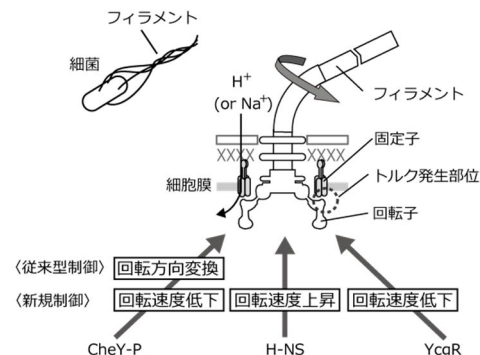


図 1. ベん毛モーター回転制御因子と制御モード

走化性における回転分子モーター制御

大腸菌以外の細菌の走化性に目を向けてみると、生育環境等に応じたさまざまな特徴が見られる。べん毛回転制御モードも菌種によって異なっている。たとえば、海洋ビブリオ属細菌の極毛(Pof, Na⁺駆動)と側毛(Laf, H⁺駆動)という2種類のべん毛は、1種類の CheY により制御されているが、Pof は大腸菌と同様に回転方向制御を受けるのに対し、Laf は一方向 (CCW) にしか回転せず、速度制御を受けることが示されている(図 1; Kojima *et al.*, 2007)。また、Pof は忌避応答の際、頻繁にスイッチを繰り返す(Homma *et al.*, 1996)ことから、CheY に対する親和性が低い、または回転方向制御の協同性が高いなどの原因が考えられる。興味深いことに、Pof は、細胞分化におけるセンサーとしても機能する(Kawagishi *et al.*, 1996)。また別の例として、研究分担者の西山は、深海に棲息する細菌(地球で最も深いマリアナ海溝最深部 11,000m から採取された *Shewanella benthica*)は、常圧では泳がないが、高圧力をかけると泳ぎ出すことを見出している。しかし、多くの菌は培養や遺伝子操作が困難であり、走化性応答の分子機構の解析は進んでいない。また、べん毛の位置・本数・鞘の有無などにより、モーター回転計測自体が困難な菌も多く、異なる特徴をもつモーター間の比較解析は難しい。

これまでの走化性研究における構成的アプローチ

走化性システムの構成的解析は遅れている。キナーゼ・アダプターと巨大複合体を形成する受容体や内膜・細胞壁・外膜を貫くべん毛モーターを人工膜中に再構成することの困難さから、*in vitro* 再構成の試みは限定的である。そこで、大腸菌をモデル系にした *in vivo* 再構成が試みられている。受容体に関しては、他の細菌と大腸菌の間でキメラを作製した解析において、成果が得られている(Bi *et al.*, 2016)。べん毛モーターに関しても、固定子のキメラ作製は成功している(Asai *et al.*, 2000, 2003)が、モーター回転制御に関しては、このような試みはなされていない。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究課題では、極毛性細菌のべん毛モーターを大腸菌内に再構成し、異なる様式のモーター制御を統一的に調べる系を開発する。そのうえで、圧力という、遺伝子操作のみではできない変調を与えて解析することで、理解の立ち遅れている回転モーター制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

以下のような、異なる取り組みを総合して、べん毛モーター回転制御のダイナミクスの解明を目指した(図2)。

- (1) 異種モーターを大腸菌内で再構成し、異種モーターのリン酸化型 CheY (CheY-P) による回転制御を定量的に比較できる系を構築する
- (2) モーターに高圧力などの変調を与えることにより、モーターと CheY-P の相互作用に関する実験データを得る(適宜、変異導入も組み合わせる)
- (3) CheY-P と FliM との相互作用に対する圧力の影響に関して分子動力学的計算を行う
- (4) CheY-P-FliM 複合体、およびモーター制御のためのセンシング系の X 線結晶構造解析を行う

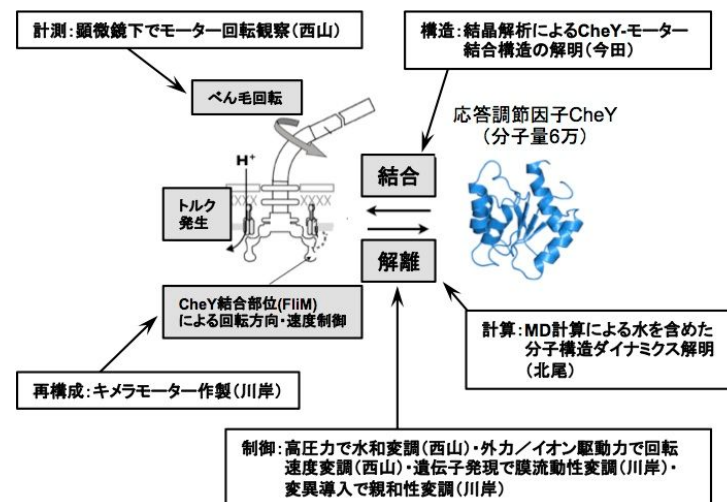


図2. 研究体制と役割分担

4. 研究成果

CheY による回転方向制御の解明を目指し、大腸菌に圧力という変調をかけ、その影響を調べた。走化性野生株のべん毛回転は、約 50 MPa 程度で反時計回り(CCW)に固定された。常圧でリン酸化非依存的に時計回り(CW)回転を引き起こす変異型 CheY を発現した株でも 80 MPa 程度ではほぼ 0 に低下した(図3)。この結果から、高圧力により CheY リン酸化レベルが低下するものではなく、CheY とモーターとの相互作用が低下することが示唆された。走化性シグナル伝達系遺伝子を欠失した株中で、モーター回転方向制御蛋白質 CheY の発現量を増加させたり、モーターとの親和性が上昇する変異を導入したりすると、CCW 回転固定により高い圧力が必要となった。また、CheY の標的であるモーター蛋白質 FliM に、CheY 非依存的 CW 回転を引き起こす変異を導入すると、高圧力下でも CCW 回転を引き起こさなかった。さらに、分子動力学(MD)シミュレーションとカスケード型並立 MD (PaCS-MD)により、高圧力が CheY の第 1 水和殻の水分子密度を上昇させ、CheY-FliM 界面への水分子の侵入を誘導することが示された。また、結合自由エネルギーの圧力依存性から、圧力が 100 MPa まで上昇すると CheY-FliM 結合が有意に弱まることが示唆された。CheY-FliM の解離に必要な自由エネルギーの値は、モーター回転計測から推定された値とよく一致した。以上の結果を総合して、べん毛モーターの回

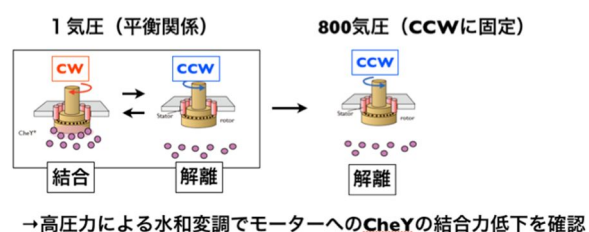


図3. 野生型大腸菌モーター回転に対する高圧力の影響

転制御の決定的ステップは、リン酸化型 CheY が FliM の N 末端配列にアンカーされることでありと結論された(Hata *et al.*, 2020; Kawagishi *et al.*, in preparation) .

つぎに、コレラ菌のべん毛の回転制御について構成的手法を用いた解析を行った。コレラ菌は、細胞極に 1 本のべん毛(極べん毛)をもち、数本の周べん毛をもつ大腸菌とは異なる走化性行動を示す。その行動パターンから、コレラ菌では CheY と FliM との結合親和性が低い可能性が考えられた。これを検証するために、コレラ菌 CheY および CheY 主要結合部位である FliM の N 末端配列を置換した大腸菌-コレラ菌キメラ FliM を大腸菌に発現させてべん毛モーターの回転を計測した(図 4)。CheY 発現量と回転方向の関係性を求めたところ、キメラ FliM 発現菌では、CheY の発現量増加に伴って CW 回転する割合の上昇は、高い協同性を示した。FliM 結晶構造から、大腸菌 FliM の R94 残基がサブユニット間相互作用に重要と予測された。そこで、キメラ FliM 大腸菌由来領域内の R94 を、対応するコレラ菌のアミノ酸残基(N)に置換したところ、CheY-FliM 結合親和性は変化しなかったが、回転方向制御の協同性が低下した。この結果を踏まえて、コレラ菌 FliM の N93 を大腸菌型(R)に置換して、コレラ菌遊泳解析を行うと、前進後退切換えの協同性が上昇し、高濃度の忌避物質環境下で前進後退切換え頻度が減少した。また、高輝度暗視野顕微鏡を用いてべん毛を可視化した状態での観察では、忌避物質添加時に、多くの菌体がべん毛を前にして泳いでいた。つまり、大腸菌型 FliM が発現しているコレラ菌のべん毛は、高濃度忌避物質に曝されると CW 回転し、菌は直線的な後退運動した。以上の結果から、極べん毛をもつコレラ菌の忌避応答における切換え頻度上昇は、走性を示すために決定的に重要な性質であること、CheY の FliM に対する結合協同性が低く調整されることで引き起こされる現象であると結論された(Tajima *et al.*, in preparation) .

以上の成果は、べん毛モーター回転制御機構の解明にとって重要な知見である。残念ながら、CheY-FliM 共結晶は得られなかったが、コレラ菌走化性受容体については、重要な構造的知見が得られた。とくに、二価カチオンは CheY-FliM 相互作用に関与するとされてきたが、Ca²⁺イオンがある種の誘引物質の感知にも関与ことが示されたことは、重要な知見である(Takahashi *et al.*, 2019, 2020) .

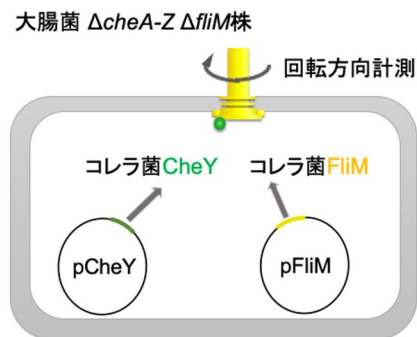


図 4. コレラ菌モーター回転制御機構の構成的解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hata Hiroaki, Nishihara Yasutaka, Nishiyama Masayoshi, Sowa Yoshiyuki, Kawagishi Ikuro, Kitao Akio	4. 巻 10
2. 論文標題 High pressure inhibits signaling protein binding to the flagellar motor and bacterial chemotaxis through enhanced hydration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-020-59172-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hata Hiroaki, Nishiyama Masayoshi, Kitao Akio	4. 巻 1864
2. 論文標題 Molecular dynamics simulation of proteins under high pressure: Structure, function and thermodynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129395-129395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yohei, Nishiyama So-ichiro, Kawagishi Ikuro, Imada Katsumi	4. 巻 523
2. 論文標題 Structural basis of the binding affinity of chemoreceptors Mlp24p and Mlp37p for various amino acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 233-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yohei, Nishiyama So-ichiro, Sumita Kazumasa, Kawagishi Ikuro, Imada Katsumi	4. 巻 201
2. 論文標題 Calcium Ions Modulate Amino Acid Sensing of the Chemoreceptor Mlp24 of <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00779-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1128/JB.00779-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 川岸 郁朗, 田島 寛隆, 山本 健太郎, 西山 宗一郎	4. 巻 4
2. 論文標題 コレラ菌のタウリン走性とその受容体	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 タウリンリサーチ	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.32172/taurine.4.1_9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西山 宗一郎, 高橋 洋平, 今田 勝巳, 川岸 郁朗	4. 巻 57
2. 論文標題 コレラ菌タウリン・アミノ酸走性受容体の同定とそのリガンド認識機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 291-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2142/biophys.57.291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 田島寛隆, 三浦勇輝, 西川正俊, 曾和義幸, 川岸郁朗
2. 発表標題 周毛性・極毛性細菌べん毛モーター回転方向制御における協同性
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 Activation of molecular machinery in living cells using high-pressure techniques
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム1SHA 「静水圧刺激により生命機能を操作する」 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1．発表者名 川岸郁朗
2．発表標題 Effects of high hydrostatic pressure on the rotation of the bacterial flagellar motor
3．学会等名 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム1SHA 「静水圧刺激により生命機能を操作する」(招待講演)(国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 今田勝巳, 辻井美香, 永江峰幸, 畑宏明, 渡邊朋信, 西山雅祥, 北尾彰朗, 渡邊信久
2．発表標題 Structural basis of pressure response of a pressure sensitive YFP variant protein
3．学会等名 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム1SHA 「静水圧刺激により生命機能を操作する」(招待講演)(国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 畑宏明
2．発表標題 Pressure effects on protein-protein interactions studied by molecular dynamics simulations
3．学会等名 第57回日本生物物理学会年会 シンポジウム1SHA 「静水圧刺激により生命機能を操作する」(招待講演)(国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 田島寛隆, 三浦勇輝, 西川正俊, 曾和義幸, 川岸郁朗
2．発表標題 極毛性細菌べん毛モーターの回転方向制御における協同性
3．学会等名 第53回ビブリオシンポジウム
4．発表年 2019年

1．発表者名 川岸郁朗
2．発表標題 コレラ菌走化性における環境情報感知機構
3．学会等名 第93回日本細菌学会総会 シンポジウムS10「環境に対応する微生物の生存戦略」（招待講演）
4．発表年 2020年

1．発表者名 三浦勇輝，西川正俊，西山宗一郎，田島寛隆，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 極毛性コレラ菌の走化性におけるべん毛モーター回転方向制御
3．学会等名 第101回細菌学会関東支部総会
4．発表年 2018年

1．発表者名 畑宏明，西原泰孝，西山雅祥，川岸郁朗，北尾彰朗
2．発表標題 カスケード型超並列シミュレーションで見るタンパク質間結合の圧力依存性
3．学会等名 第18回蛋白質科学会
4．発表年 2018年

1．発表者名 畑宏明，西原泰孝，西山雅祥，曾和義幸，川岸郁朗，北尾彰朗
2．発表標題 高圧力下でのバクテリア運動観察
3．学会等名 2018年度べん毛研究交流会
4．発表年 2019年

1．発表者名 川岸郁朗
2．発表標題 細菌べん毛モーター回転の制御機構
3．学会等名 2018年度遺伝研研究会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 三浦勇輝，沢田孝，西川正俊，西山宗一郎，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 単極べん毛菌におけるモーター回転方向制御
3．学会等名 第3回 法政大学・立教大学 微生物研究会
4．発表年 2017年

1．発表者名 川岸郁朗
2．発表標題 バクテリアは世界をどのように見ているのか？
3．学会等名 第3回 法政大学・立教大学 微生物研究会（招待講演）
4．発表年 2017年

1．発表者名 H. Hata, Y. Nishihara, M. Nishiyama, I. Kawagishi, A. Kitao
2．発表標題 Protein-peptide dissociation at high pressure studied by parallel cascade selection molecular dynamics simulations
3．学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4．発表年 2017年

1 . 発表者名 Takahashi Y, Sumita K, Nishiyama S, Kawagishi I, Imada K.
2 . 発表標題 Distinct mechanisms of ligand recognition between Mlp24 and Mlp37, chemoreceptor proteins of <i>Vibrio cholerae</i>
3 . 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. Onogi, N. Sagoshi, S. Nishiyama, Y. Sowa, I. Kawagishi
2 . 発表標題 Temperature-regulated expression of the gene encoding the taurine chemoreceptor Mlp37 of <i>Vibrio cholerae</i>
3 . 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 M. Matsuda, T. Shiroi, K. Imada, S. Nishiyama, M. Sakuma, M. Homma, I. Kawagishi
2 . 発表標題 Role of divalent metal cations in ligand recognition by the citrate chemoreceptor Tcp of <i>Salmonella enterica</i>
3 . 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 T. Sagawa, R. Mashiko, Y. Yokota, Y. Naruse, Y. Sowa, I. Kawagishi, M. Okada, K. Oiwa, H. Kojima
2 . 発表標題 Prediction of attractants for the chemoreceptors of <i>Escherichia coli</i> using machine learning
3 . 学会等名 日本生物物理学会第55回年会
4 . 発表年 2017年

1．発表者名 遠藤 貴秀，西川正俊，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 大腸菌二成分制御系AtoS，AtoCの相互依存的細胞極局在
3．学会等名 第 100 回 日本細菌学会関東支部総会
4．発表年 2017年

1．発表者名 伊藤那奈，山崎友也，西川正俊，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 大腸菌走化性受容体クラスター形成に対するヒスチジinkinナーゼCheA，アダプターCheWおよび異種受容体の影響
3．学会等名 第 100 回 日本細菌学会関東支部総会
4．発表年 2017年

1．発表者名 高橋洋平、住田一真、内田裕美子、西山宗一郎、川岸郁朗、今田勝巳
2．発表標題 コレラ菌走化性受容体のリガンド認識機
3．学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第90回日本生化学会大会）
4．発表年 2017年

1．発表者名 三浦勇輝，西川正俊，西山宗一郎，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 単極毛細菌の走化性におけるべん毛モーター回転方向制御
3．学会等名 2018年生体運動研究合同班会議
4．発表年 2018年

1. 発表者名 I. Kawagishi, S. Nishiyama
2. 発表標題 Chemotaxis as a critical feature in the pathogenicity of <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 Indo-Japan Conference on EPIGENETICS AND HUMAN DISEASE (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川岸郁朗, 西山宗一郎
2. 発表標題 コレラ菌のタウリン走性とその受容体
3. 学会等名 第4回国際タウリン研究会 日本部会in熊本 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畑宏明, 西原泰孝, 西山雅祥, 川岸郁朗, 北尾彰朗
2. 発表標題 カスケード型超並列シミュレーションでみるCheY - Flim複合体解離に対する圧力の影響
3. 学会等名 2017年度べん毛研究交流会 (第23回)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦勇輝, 西川正俊, 西山宗一郎, 曾和義幸, 川岸郁朗
2. 発表標題 単極毛性コレラ菌の走化性におけるべん毛回転方向制御
3. 学会等名 2017年度べん毛研究交流会 (第23回)
4. 発表年 2018年

1．発表者名 西山宗一郎，小野木汐里，川岸郁朗
2．発表標題 コレラ菌タウリン走性受容体の温度依存的発現調節
3．学会等名 2017年度べん毛研究交流会（第23回）
4．発表年 2018年

1．発表者名 門間万里子，辻友香子，西山宗一郎，西川正俊，曾和義幸，川岸郁朗
2．発表標題 海洋ビブリオ属細菌走化性におけるトランスデューサーと可溶性受容体
3．学会等名 2017年度べん毛研究交流会（第23回）
4．発表年 2018年

1．発表者名 高橋洋平，住田一真，西山宗一郎，川岸郁朗，今田勝巳
2．発表標題 コレラ菌走化性受容体Mlp24，37のリガンド認識機構の差異
3．学会等名 2017年度べん毛研究交流会（第23回）
4．発表年 2018年

1．発表者名 川岸郁朗
2．発表標題 コレラ菌走化性受容体の構造と機能
3．学会等名 2017年度遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞内装置の構造と機能」（招待講演）
4．発表年 2018年

1. 発表者名 川岸郁朗，三浦勇輝，西川正俊，曾和義幸
2. 発表標題 コレラ菌走化性におけるべん毛モーター回転方向制御
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	西山 雅祥 (Nishiyama Masayoshi) (10346075)	近畿大学・理工学部・准教授 (34419)	
研究 分担者	北尾 彰朗 (Kitao Akio) (30252422)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	
研究 分担者	今田 勝巳 (Imada Katsumi) (40346143)	大阪大学・理学研究科・教授 (14401)	